

气相色谱法测定鱼油微胶囊中 EPA 和 DHA 的含量

刘爱琴, 罗超杰, 孙晓霞, 许新德, 洪毅敏

(浙江医药股份有限公司新昌制药厂, 新昌 312500)

摘要: 鱼油富含 $\omega-3$ 不饱和脂肪酸, 主要包括二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA)。本文主要研究了用气相色谱内标法测定鱼油微胶囊产品中的 EPA 和 DHA 的含量。在充氮保护下, 采用氢氧化钾-甲醇酯化法将鱼油微胶囊中的脂肪酸快速、有效地转化成脂肪酸甲酯, 以二十一碳脂肪酸甲酯为内标, 建立了 EPA 和 DHA 的定量分析法。使用 HP-INNOWAX 毛细管柱 (30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 μ m), 载气为氦气, 其流速为 1.8mL/min, 检测器温度为 280 $^{\circ}$ C。该方法对 EPA 和 DHA 定量分析的相对标准偏差分别为 1.09% 和 1.05%, 平均回收率分别为 99.5% 和 99.3%。此检测方法简便快速、准确度高, 适合于对大量样品的分析。

关键词: EPA; DHA; 气相色谱法; 微胶囊

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-2513(2010)04-0273-04

Determination of the EPA and DHA in microencapsulation by gas chromatography

LIU Ai-qin, LUO Chao-jie, SUN Xiao-xia, XU Xin-de, HONG Yim-in

(Zhejiang Medicine Co., Ltd., Xinchang Pharmaceutical Factory, Xinchang 312500)

Abstract Fish oil had plenty of $\omega-3$ polyunsaturated fatty acids, mainly including Eicosapentaenoic acid (EPA) and Docosahexaenoic acid (DHA). The method of determination of EPA and DHA in their microencapsulation of fish oil was discussed. With the protection of N_2 , fatty acid in fish oil was derived as methyl esters using KOH-CH₃OH solution. A quantitative method with C21:0 as internal standard was determined for analyzing EPA and DHA by Gas Chromatography. HP-INNOWAX column (30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 μ m) was applied. The carrier gas was helium and its flow rate was 1.8mL/min. The detector temperature was 280 $^{\circ}$ C. The precisions of the method for the determination of EPA and DHA was 1.09% and 1.05% of RSD, respectively. The recoveries of EPA and DHA was 99.5% and 99.3% respectively. The method was simple, rapid, accurate and fit for large number of samples analysis.

Key words eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, gas chromatography, microencapsulation

鱼油是一种从海洋鱼类的脂肪中精炼而成的天然健康品, 富含 $\omega-3$ 不饱和脂肪酸。海产鱼油中或多或少地含有二十碳四烯酸 (Arachidonic acid, AA)、二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳五烯酸 (Docosapentaenoic

acid, DPA) 和二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 这四种长碳链多不饱和脂肪酸^[1]。但一般说来, 在鱼油中这四种长碳链脂肪酸只有 EPA 和 DHA 含量较高, 而且对人体的健康也较有益处。有预防心脑血管疾病、调节血脂、降低

收稿日期: 2010-02-05

作者简介: 刘爱琴, (1980-), 女, 河南新乡, 工程师, 硕士, 研究方向为食品添加剂的研发与生产。

血液粘稠度、预防脑血栓和脑梗塞、降低血压引起的脑供血不足、健脑益智、改善和增加记忆、增强人体抗癌免疫功能、抑制炎症及改善视力等功能^[2-8]。用其制成的医药品和营养保健品,具有一定的医疗保健功能,自上世纪一经发现而倍受青睐。

由于鱼油中的 EPA 和 DHA 是高不饱和脂肪酸,极易受氧、光、热、金属元素及自由基的影响发生氧化、酸败、聚合、双键共轭化等化学反应,使鱼油产生一种特殊的刺激性臭味和苦味,不仅影响鱼油的风味和品质,还使鱼油失去了营养和医用价值,对人体或动物无益,反而极为有害。即使鱼油中添加维生素 E 或其他抗氧化剂,也难以长期保存。此外,鱼油在常温下呈液态,冬季为稠状半固体状态,加工使用、贮藏和运输均不方便。针对上述问题,我们采用微胶囊技术将鱼油包埋起来,制成鱼油微胶囊,这样既可掩盖鱼油的腥味,又解决了 EPA 和 DHA 在加工和保存期的氧化稳定性问题,从而为鱼油产品的广泛应用开拓了途经。本文针对微胶囊鱼油微粒或干粉中的 EPA 和 DHA 的检测方法进行考察,力求寻找一种简便快速的气相检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

仪器:气相色谱仪 (Agilent 6890)

试剂:鱼油微粒/干粉,新昌制药厂生产

正己烷、正庚烷、硫酸、甲醇、氢氧化钾、无水硫酸钠均为分析纯

EPA 甲酯、DHA 甲酯标准样品:Signa 公司;

EPA 甲酯、DHA 甲酯、C21:0 甲酯标准样品:分别用正庚烷配制浓度为 1mg/mL 的溶液。

1.2 鱼油微胶囊微粒/干粉样品前处理

油脂中的脂肪酸以脂肪酸甘油酯的形式存在,但其沸点很高,不利于色谱分析。因此对深海鱼油样品进行总脂肪酸含量以及对各脂肪酸组分的分析测定前必须对样品进行前处理。目前运用最广泛的就是采用甲基酯化法将甘油酯转化为甲酯。

1.2.1 鱼油微胶囊微粒/干粉的预处理

称取约 1g 的鱼油微胶囊微粒/干粉于 200mL

具塞锥形瓶中,加 10mL 蒸馏水,摇匀,必要时在温热的水浴中加热溶解,使之完全分散均匀,超声 15min ,加入 100.0mL 正己烷, 10mL 无水乙醇,盖紧塞子,摇匀,然后超声 10min 。再加 5mL 无水乙醇,摇 30s ,重复两次。静置分层,取 25.0mL 有机相转入 50mL 圆底烧瓶中, 60°C 水浴旋转蒸发器蒸去溶剂。烧瓶中提取得到的物质进行气相分析,继续作下一步处理。

1.2.2 鱼油甲酯化方法

对步骤 1.2.1 处理得到的物质进行甲酯化,加 10.0mL 内标溶液,摇匀;加入 0.5mL 2N 的氢氧化钾-甲醇溶液,振荡器上振动 10min 。将溶液转到 50mL 的离心管中, $1500\text{rpm}/\text{min}$ 离心 5min 。取上层有机相到样品瓶中,取 $1\mu\text{L}$ 进气相色谱仪。

1.3 色谱分析条件

检测器:氢火焰检测器

色谱柱: HP-NNOWAX ($30\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\mu\text{m}$);

载气:氦气,流速为 $1.8\text{mL}/\text{min}$

检测器温度: 280°C ;

分流比率: $40:1$

采用程序升温: 120°C 保持 1min ,然后以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升至 250°C ,保持 5min 。进样量: $1\mu\text{L}$ 。

2 结果与讨论

2.1 鱼油甲酯化方法的比较筛选

鱼油中的脂肪酸以脂肪酸甘油酯的形式存在,其沸点很高,不利于色谱分析,而脂肪酸甲酯的挥发性较高,便于色谱分析,因此采用甲酯化方法将甘油酯转化为甲酯。前人多采用盐酸-甲醇或硫酸-甲醇在加热回流条件下将脂肪酸甲基化后进行分离、提取,这一方法步骤繁琐、费时长且相对比较昂贵,因此本文采用氢氧化钾-甲醇溶液作为酯化溶液进行甲酯化。

2.2 甲酯化条件的优化

检测同一批次的鱼油微粒样品,采用氢氧化钾-甲醇法,甲酯化条件控制分别如下:样品 1:甲酯化条件为 60°C 水浴,酯化十分钟;样品 2:常温条件下,振荡器上振动 10min ;样品 3:常温

条件下，振荡器上振动 30m in。由表 1 可见：常温条件下进行甲酯化效果比 60℃下甲酯化好，其原因可能是，多不饱和脂肪酸对温度较为敏感，在高温下易氧化，致使含量降低。样品 2和样品 3检测结果相差较小，可见常温下振动 10m in 样品中的 EPA 和 DHA 已完全酯化。因此，我们确定酯化最佳条件为：常温振动 10m in。

表 1 样品检测结果

	样品 1	样品 2	样品 3
EPA-M (%)	1.18	1.22	1.23
DHA-M (%)	5.45	5.62	5.57
总 n-3 (%)	6.63	6.84	6.80

2.3 充氮气保护的选择

按方法规定的条件进行检测，一组在检测过程中充氮气保护，另一组不充氮气保护，由表 2 可见，不充氮气的一组 DHA、EPA 结果明显偏低。这是因为该类物质是多不饱和脂肪酸，其分子结构中有五六个双键，很容易受氧、光、热、金属元素及自由基的影响产生氧化、酸败、聚合、双键共轭化等化学反应，使结果偏低，因此本文选择使用充氮气保护。

表 2 氮气保护的影响

检测项目	不充氮气	充氮气
DHA-M (%)	1.34	1.85
EPA-M (%)	4.31	5.69
总 n-3 (%)	5.65	7.54

2.4 色谱柱的选择

我们曾采用色谱柱：HP-5毛细管柱（30m × 0.32mm × 0.25μm），HP-1毛细管柱（30m × 0.32mm × 0.25μm），HP-INNOWAX毛细管柱（30m × 0.25mm × 0.25μm），比较其分离效果。实验结果表明，HP-INNOWAX毛细管柱（30m × 0.25mm × 0.25μm）柱在上述气相色谱条件下鱼油中的多不饱和脂肪酸甲酯之间的分离效果最好。

2.5 样品检测

DHA 甲酯保留时间为 17.28min，EPA 甲酯保留时间为 14.71min，内标物保留时间为 12.10min。EPA、DHA 与其它组分分离效果较好，峰形良好，分析时间约 20min，说明方法采用色谱条件合适。色谱图见图 1。

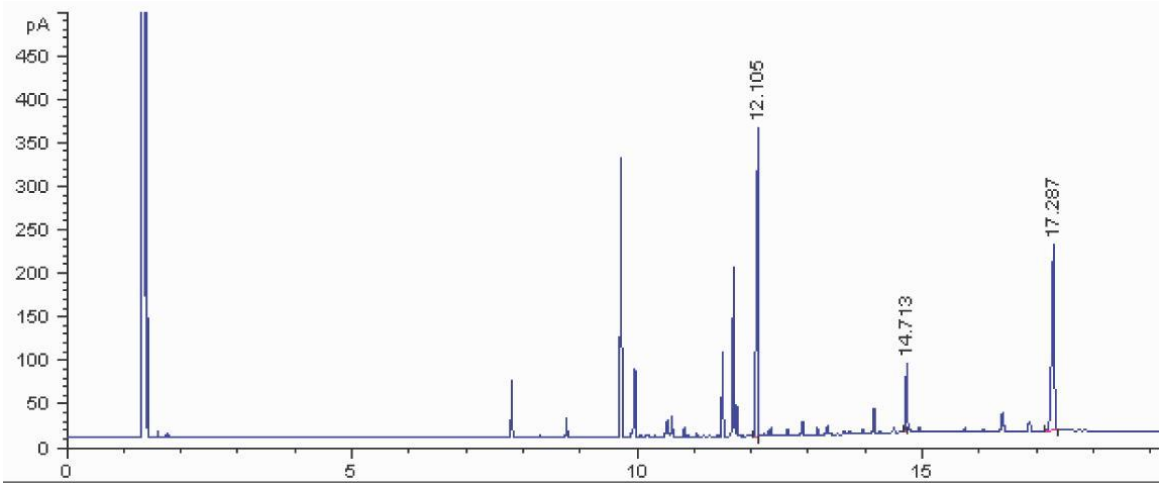


图 1 鱼油微胶囊样品色谱图

2.6 精密度试验

对同一批次鱼油样品平行检测 6次，其结果见表 3，变异系数为 1.05% ~ 1.09%，可见本方法具有较好的重复性。

表 3 精密度试验结果表

	1	2	3	4	5	6	平均值	标准偏差	RSD (%)
EPA-M	1.81	1.83	1.79	1.85	1.83	1.82	1.82	0.02	1.09
DHA-M	5.39	5.64	5.31	5.76	5.51	5.48	5.67	0.06	1.05

2.7 加标回收率

在已知含量的样品中分别加入适量的 EPA-M、DHA-M 标准品溶液，回收试验结果见表 4

回收率在 98.3% ~ 100.5% 之间，平均回收率分别为 99.5% 和 99.3%。可见本方法的准确性能满足该类产品的分析要求。

表 4 回收试验结果

	样品中含量 (mg)			加入标样 (mg)			总量 (mg)			测得值 (mg)			回收率 (%)			平均回收率 (%)
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
EPA-M	18.2	18.2	18.2	0.5	1.5	2.5	18.7	19.7	20.7	18.8	19.5	20.6	100.5	98.5	99.5	99.5
DHA-M	56.6	56.6	56.6	1.0	2.0	4.0	57.6	58.6	60.6	57.8	57.6	60.1	100.3	98.3	99.2	99.3

3 结论

(1) 试验得出：在充氮保护下，采用氢氧化钾-甲醇法，常温下振动 10min 进行甲酯化，该酯化条件下酯化较为完全，且操作简单方便。

(2) 本文建立了微胶囊鱼油中 EPA 和 DHA 的气相色谱测定的分析方法。该方法有较好的精密度和回收率，并且该检测方法操作简便快速，为鱼油微胶囊产品的生产和应用提供了依据。

参考文献:

[1] Ackman R G. Fatty acid composition of Fish Oils 1998: 25-28

[2] 宋海林, 王芳. 鱼油多不饱和脂肪酸在临床中的应用 [J].

黑龙江医药, 2004 (5): 374-375

[3] 刘超然. 多价不饱和脂肪酸研究的新动向 [J]. 中国油脂, 1987, 57 (6): 2

[4] 谭玲, 傅得兴, 等. 鱼油制剂药理作用及临床应用进展 [J]. 中国海洋药物, 1998 (4): 30-33

[5] 郭海丽. 鱼油制剂的药理作用和临床应用 [J]. 天津药学, 1997 (3): 22-23.

[6] Berthold Koletzka, Eric Lien, et al. The role of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations [J]. Perinat Med 36 (2008) 5-14.

[7] Kummer JM, Bigaouette J, Michalek AV, et al. Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations rheumatoid arthritis. Lancet 1984 (1): 184.

[8] Kojima Y, Terano T, Tanabe E, et al. Effect of highly purified EPA on psoriasis. J Am Acad Dermatol 1989 21: 150

《中国食品添加剂》杂志—双核心期刊，欢迎投稿!